

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月20日

| | | | |
|------------------------------------|------|----------------|---------|
| (51) Int.Cl. ⁹ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I |
| C 1 2 P 21/08 | | 9161-4 B | |
| C 0 7 K 16/00 | | 8318-4 H | |
| 16/18 | | 8318-4 H | |
| 16/32 | | 8318-4 H | |
| | | 9050-4 B | |
| | | C 1 2 N 15/ 00 | Z N A A |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願平6-514437
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月10日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/12039
 (87) 国際公開番号 WO94/13806
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)6月23日
 (31) 優先権主張番号 990, 263
 (32) 優先日 1992年12月11日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

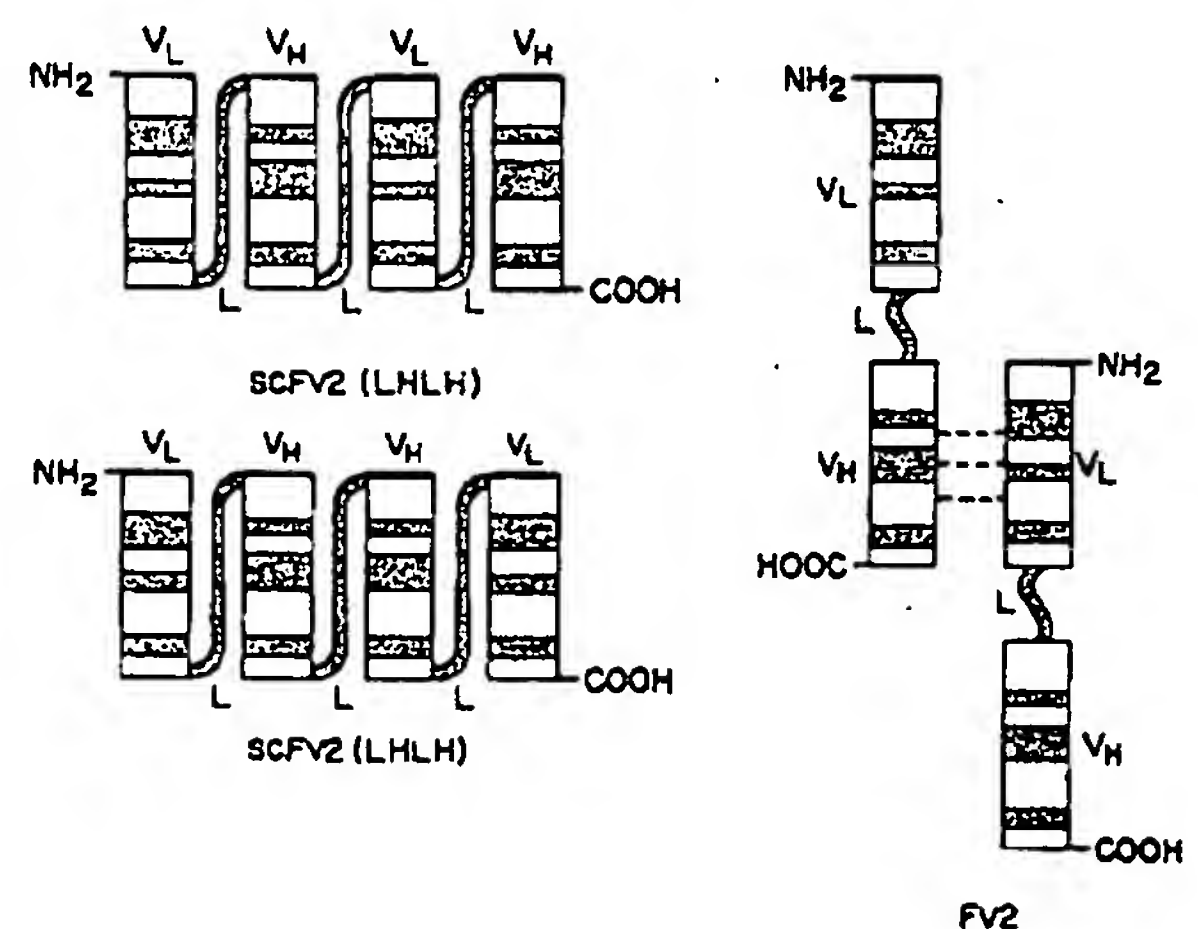
(71) 出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030
 (72) 発明者 メゼス, ピーター エス.
 アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25
 (72) 発明者 ゴーリー, ブライアン ビー.
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57) 【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



特許(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys
Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

特許(内容に変更なし)

明細書

多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV_L及びV_Hと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
 - (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;
- を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、標的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体様分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV_Lと一本のV_Hとにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

一 (米国特許第 4,946,778号) により連結された V_L-L-V_H ポリペプチドを成しており、ここではペプチドリンカーを表している。 V_L と V_H ドメインが配向 V_H-L-V_L である scFv が米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の 2 つの結合部位と比べて scFv は一つのそれを有するため、scFv は 2 以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有する scFv の構築体を得ることが有利であろう。加えて、標的組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベースを増加を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体捕獲を可能とする二価特異的である多価 scFv を獲得することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の V_L と一本の V_H ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できうることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は 2 本以上の軽鎖可変ドメインと 2 本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

図 5 は CC49V_L のアミノ酸配列を示す。

図 6 は p49LHLH における CC49 一本鎖抗体 LHLH のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 7 は p49LHHL における CC49 一本鎖抗体 LHHL のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 8 はプラスミド pSL301T 及び pSL301HT の構築を示す。

図 9 はプラスミド p49LHHL の構築を示す。

図 10 はプラスミド p49LHLH の構築を示す。

図 11 は CC49IgG、CC49scFv2 及び CC49scFv を用いた、競合因子としてビオチニル化 CC49IgG を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

核酸、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらは IUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実践に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv) 又は「抗体フラグメント」なる語は、 V_L-L-V_H により表わされる、ペプチドリンカー (L) により V_H ドメインに連結された V_L ドメインを含むポリペプチドを意味する。 V_L と V_H ドメインとの順序は逆であってよく、 V_H-L-V_L として表わされるポリペプチドが獲得できうる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した 2 以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$; $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$; $V_H-L-V_L-L-V_H-L-V_L$; 又は

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が 2 種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

図面の簡単な説明

図 1 は、 $V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ (LHLH) と $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型 P_v 一本鎖抗体 (P_v2) を示す。

図 2 は CC49V_L のヌクレオチド配列を示す。

図 3 は CC49V_L のアミノ酸配列を示す。

図 4 は CC49V_H のヌクレオチド配列を示す。

$V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_H$

の V_L と V_H ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された 1 又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 V_L と V_H ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_L$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H$

で表される多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ (LHLH) 及び $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図 1 に示す。非共有結合型 P_v 一本鎖抗体 (P_v2) も図 1 に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び／又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U. S. Department of Health and Human Services により公開された Kabat の Sequences of Proteins of Immunological Interest 第 4 版 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

源として、逆転写酵素伸介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログ ATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できうる。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は課題の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性抱合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施されうる。通常、最後の負荷の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できうるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。

課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_L及びV_Hドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願WO 80/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願WO 89/00692に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開WO 90/04410及びWO 89/00692に

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantolianoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXho I部位と、他端にあるHind III部位により指定されるコドンを変えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(E. coli)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できうる。S. セレビジエ(S. cerevisiae)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV_L及びV_Hドメインである。CC49のV_Lをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリinkerを得ることが必要である。V_HとV_Lドメインを連結するための適当なリンカーは、V_HとV_Lドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものと構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV_H及びV_Lドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できうる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できうる。

好ましくは、V_HとV_Lドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリinkerと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリinkerとは実質的に同じアミノ酸配列を有

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(Pichia pastoris)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/0又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できうる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSVL及びpKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウィルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲードする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされうる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされうる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換え DNA 技術を用いて構築されたベクターにより超換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養培地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この態様において、かかる純粋な形質転換細胞の培養物は生存のために誘発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、且つ屈折体 (refractile bodies)、通称封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HCl による可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により測定できうる。

| | |
|----------------|---------------------------------|
| IEP | 等電点電気泳動 |
| Kbp | キロ塩基対 |
| LB | Luria-Bertani 培地 |
| Mab | モノクローナル抗体 |
| MES | 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸 |
| MW | 分子量 |
| NBT | ニトロブルーテトラゾリウムクロリド |
| オリゴ | オリゴヌクレオチド |
| PAG | ポリアクリルアミドゲル |
| PAGE | ポリアクリルアミドゲル電気泳動 |
| PBS | リン酸緩衝食塩水 |
| PCR | ポリメラーゼ連鎖反応 |
| pSCFV | SCFVをコードする DNA 配列を含むプラスミド |
| RIGS | ラジオイムノガイド外科 |
| RIT | ラジオイムノ治療 |
| scFv | 一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントモノマー |
| scFvs | 共有結合した一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントダイマー |
| SDS | ドデシル硫酸ナトリウム |
| TBS | トリス緩衝食塩水 |
| トリス | (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン) |
| TTBS | ツイーン 20 洗浄液 |
| V _H | イムノグロブリン重鎖可変ドメイン |
| V _L | イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン |

抗 体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459 として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は 1 又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表層上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって抱合されうる。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

略 語

| | |
|----------|--|
| BCIP | 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート |
| bp | 塩基対 |
| Bis-Tris | プロパン (1, 3-ビス (トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ) プロパン) |
| BSA | 牛血清アルブミン |
| CDR | 相補性決定領域 |
| ELISA | 酵素結合免疫吸着アッセイ |
| Fv2 | 非共有一本鎖 Fv ダイマー |

CC49FAB: 重鎖の N-末端領域に連結している完全軽鎖より成る CC49 の抗原結合性領域。

CC49scFv: ペプチドリッカーにより連結されている CC49 抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している 2 つの CC49scFv。Fv の後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv6 は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3 つのリンカーにより連結されている、2 本の CC49V_L ドメインと 2 本の V_H ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_L (L) と V_H (H) ドメインとを連結し合わせるのに 6 つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHHL, LLHH, HLLH, HLHL 及び HHLL。

プラスミド

pSCFV UHM: 25 のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49 の可変軽鎖と CC49 可変重鎖とより成る scFv についてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scFv2 LHLH 又は LHHL 生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することによって本明細書に組入れる。Sambrook ら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第 2 版 (1989) 及び Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準の β -シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸化アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40 μ lの滅菌水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム(Millipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶液の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD₂₆₀)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BM, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により識別化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Union Carbide Corp., Chicago)の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

より測定した。scFv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20 μ l)を、非還元用サンプル調製バッファ-Sepraso 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Daiichi Minigelにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当り55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーR-250(Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており(Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オバルブミン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、B-ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15~20分平衡にした。Immobilon-P PVDF(ポリビニリデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一箇の陽極バッファ#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを陽極バッファ#1の中に浸し、そしてその電

CA)を用いて溶解させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート(Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 μ lのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 μ lの試験抗体及び25 μ lのビオチニル化CC49(1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる競合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 μ g/mlのCC49及び10 μ g/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又は濃LBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの抱合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 μ l(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 μ lのパラーニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404~450nmでの光学密度スキャンに

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファ(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mAの定常電流(初期電圧は8~20ボルトに範囲した)を用いて30分で達せられた。

ブロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロックし、そして20mlずつの0.5%のツイーン20洗浄液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当り混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化FAID 14溶液とした(10 μ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当り1gのBSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl₂·H₂O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

での基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120 μ lを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色膜からそれらを水で洗い流した。

バイオチニル化 PAID 14

PAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イディオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。PAID 14を Nygene Protein Aアフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただし溶離バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。画分を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH \sim 7に中和した。バイオチニル化反応は下記の通りに設定した。PAID 14(1mg、水の中で100 μ l)を100 μ lの0.1MのNa₂CO₃ pH 9.6と混合した。バイオチニル-e-アミノ-カプロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20 μ l)をPAID 14溶液に加え、そして22 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。過剰のバイオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8 μ l/minの流速で、バイオチニル化PAID 14は18.8minのピークで出現した。このピークを構成する画分をプールし、そして4 $^{\circ}$ Cで保存し、そしてCC49V_h及びV_hCDRにより決定

これらの値は、D.B. Watlauer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375 \sim 378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC49scPv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン製配管を用いたLKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定されたUV CORD SII 2238型検出装置および2211型 SuperRac fraction collectorで構成されている。

サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド標的(pSCPVUHM)；100ピコモルのプライマー；1 μ lのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク所在のPEC社)のAmpli-Tagポリメラーゼ；16 μ lの10mM dNTPおよび10 μ lの10 \times 緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている)；ならびに合計容積を100 μ lにするのに十分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのと同様に同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94 $^{\circ}$ Cで20 \sim 45秒間のDNAの変性；52 \sim 60 $^{\circ}$ Cで0.5 \sim 1.5分間のアニーリングおよび72 $^{\circ}$ Cで0.5 \sim 2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の380A型もしくは391型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR(Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータプログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、IsogelアガロースIEPプレート、pH域3 \sim 10(FMC Bioproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、 β -ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンチルレクチン及びチトクロームCを含み、それとのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び9.60である。ゲルを、PMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体種の定量

IgG, scPv2の種および単量体scPvを含む精製CC49抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E₁)は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_1 = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys})2\text{数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10$$

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20 μ l)は最初18 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、次いで一夜4 $^{\circ}$ Cまで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、100 μ lのStratagene社の大腸菌(E.coli)AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1 \sim 5 μ l)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37 $^{\circ}$ Cで1時間再生させ、続いて、pSCPVUHM, p49LHLHもしくはp49LHHLに用いる20 μ g/mlのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100 μ g/mlアンピシリン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニブレッププラスミド製造キットを用いて、淘汰圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱説明書にしたがって使用した。

プラスミドの構築

p49LHLHおよびp49LHHLと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_Hで表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV_LとV_HはCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHHLを含有する宿主細胞は、 V_L -L- V_H -L- V_L -L- V_H で表すことができるポリペプチドを産生した。ここで V_L と V_H はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49 V_L -L- V_H -L- V_L -L- V_H (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49 V_L -L- V_H -L- V_H -L- V_L (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)のペニシリナーゼP (penP) ターミナーターの配列を、Nhe I および BamH I で45分間消化することによって、pSCFV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気溶出させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社) 中の同じ部位に連結した。pSCFV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出願の米国特許願第07/935,695号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCFV UHMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列；固有Nco I 制限部位；CC49 V_L 領域；Hind III 制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；固有Xho I 制限部位；CC49 V_H 領域；Nhe I 制限部位；penPターミナーター；およびBamH I 制限部位を含有している(図8参照)。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Mezesら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218 頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3 μ L)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含むポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサーズバーグ所在)のT7 Quickprime ³²P DNA 標識キットと、Bulowelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-Nhe I-BamH I ターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamH I および Nhe I による消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。Nhe I-BamH I penPターミナーターをpSL301中に配置した理由は、そのNhe IとBamH Iの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要がある V_L と V_H の領域を統括して構築するため設計された。各V領域がEco47III-Nhe I 部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

V_L 配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAAA GCT ACC ACCA AGC GCT TAG TGA CGA GAG GGT GAC TGA GGT-3'

下線を付けた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅された V_H DNAを、4%のPAG、電気溶出、エタノールによる沈殿および20 μ L水への溶解によって精製した。その V_H 配列をXho I と Nhe I の制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され続いて精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4 μ L)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49 V_H インサートを含むことを示す候補的クローンをNhe I およびXho I 消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB (pSL301ベクター中、Xho I 部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49 V_H の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49 V_H 配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HLHTおよびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使った。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12) および CC49 V_H (SEQ ID NO: 13) のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

実施例1 p49LHHLの構築

pSL301HT (5 μ g) を出発物質として用い、これをEco47IIIおよびNhe I で消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49 V_H 挿入フラグメントは、5' オリゴとして SCPGCを用いかつ

3' オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP6Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14) は下記のとおりである。

SCP6B: 5' -TAAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT GTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG
TCT-G'

またオリゴ SCPGBはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp 8~76)を含有している。pSCFV UHM中のCC49VH標的のアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp77~80由来のものである。

下線を付けた配列はPsp I 部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、Fsp I と Nhe I で消化し次いでpSL301HT Eco47III-Nhe I ベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(3 μ L)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HHT 生成物を示す正しい大きさのXho I-Nhe I インサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSQP1を用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SQP1のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SQP1: 5' -TC ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカー V_L サブユニット(bp1544~1863、図7)は、5' オリゴのSCP7bと3' オリゴのSCP8aを用いかつPCRの標的としてpSCFV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT GTT GAG ATT GTC ATG TCA CAG TCT
CC

下線をつけたヌクレオチドは Fsp I 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC
CAG CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の一組は Nhe I 部位に相当し、もう一つの組は Afl II 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド8〜76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544〜1612)、一方V_Lにアニールするヌクレオチド77〜99は図7の1613〜1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短いテール、Nhe I 制限部位、終止コドン、Afl II 制限部位およびV_Lの最後の21個の塩基を含有している。Fsp I と Nhe I による消化の後、この得られた 420bpのインサートを精製して精製pSL30HHTベクターの Nhe I と Eco47 III の部位に連結し、候補的なクローンを Nhe I と Xho I でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ49LFR2(-)とSQP1で配列が決定されて、pSL30IHHT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19)は下記のとおりである。

49LFR2(-): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドpSL30IHHTを Xho I および Nhe I で消化し、精製し、得られた1179bp V_H-リンカー-V_H-リンカー-V_Lセグメントを pSCPV UHMに連結して p49LHHLを製造した。なおこの pSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4 μl 部分)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHHLを含有させるために選択した。p49LHHLは、CC49多価一本鎖抗体 scFv2: V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L または CC49scFv2 (LHHL)の penP プロモーターとヌクレオチ

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531はDNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47 III 部位を形成した。図6のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴSCP6Cの末端に5塩基の欠失を組込むことによりpSL30IHHTを製造した。

SCP6C: 5' -TAAGCGCTGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA
GGACGACGCAAAAAAAGATGATGCAAAAAAAGGATCTGG
AGGTTCAAGTTGACGACGTCTGAC-3'

SCP6C中の下線をつけた配列は Eco47 III 部位に相当する。PCRにおいて、SCP6Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP10は3'オリゴとして用いられ、リンカー CC49V_Lセグメントが生成する。

SCP10のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA
CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1958〜1963に見られる Nhe I 部位に相当する。この場合、PCRインサートはNhe I だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL30IHHT)はEco47 III 部位(先に形成されている)および Nhe I 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μl)を使ってコンピテント E. coli AG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンを Xho I と Nhe I でスクリーニングした。正しい大きさ

の配列を含有している。

実施例2: p49LHHLの構築

p49LHHLの構築を図11に図式的に示す。リンカーV_Lのサブユニットを5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC
AGC ACC AGC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8〜76)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図6のV_Lのヌクレオチド1193〜1215に相当する、PCRに対する pSCPV UHM 標的(ヌクレオチド77〜99)にアニールした。

SCP9は、Nhe I 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47 III 部位(第二の下線を付けたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受け取るための pSL30IHHTを作るのに必要な制限部位である。SCP8のヌクレオチド18〜23は図6のヌクレオチド1532〜1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24〜46は、PCRにおけるSCP8のアニール領域である図6に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミドpSL30IHHTを Eco47 III と Nhe I で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め Fsp I と Nhe I で処理され精製された、PCRからのリンカー-CC49V_L DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3 μl)を用いて大腸菌AG1コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい Xho I - Nhe I の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21)は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL30IHHTクローン中に PCRの誤まり

のDNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCDR3(+)およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCDR3(+))のDNQ ID NO: 24)は下記のとおりである。

49VLCDR3(+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1533〜1963からの配列が確認され、正しいpSL30IHHTクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHHLを製造するために、pSL30IHHT(5 μg)を Nhe I と Xho I で消化し、次いでV_H-L-V_L-L-V_H配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM(5 μg)を Xho I と Nhe I で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4 μl)を使ってコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAM20 プレート上にプレートし、次いで p49LHHLに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)および TAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

実施例3 CC49 scFv2のLHHLとLHHLが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の固分を、p49LHHLと p49LHHLの両者の1.0Lの一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を250ml づつの4部分に分割し、Sorvall GS-3 ロータで10分間 5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mM トリス-HCl pH 7.3からなる100ml中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mlの30mM トリス-HCl pH 3で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v%

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL) および10mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞 (hyper tonic cell) を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの氷冷 0.5mM MgCl₂中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の面分を含有する上澄み液を、0.2μmの Nalge社 (米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在) の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社 (米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在) の Centriprep 30およびCentricon 30で 1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたは p49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック (shockate) を、Pharmacia社 (米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在) の Superdex 75 HR 10/30 HPLC カラム (予め PBSで平衡化させたもの) に注入した。競合 ELISA法で測定する場合、問題の生成物は 0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性面分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3~4回交換しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料を Pharmacia社の Mono Q HR 5/5 アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20Mトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaCl を用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合 ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の面分の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリリアン

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 8.00, 8.20 および 8.6であった。ゲルは FMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTAR プログラムによって両方の scFv2の種のpI値として 8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の 8.9の位置にみとめられた。

IgG, scFv2 (LHLHおよびLHHL) のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値E_m は各々、先に引用した Wetlawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2LHLH, CC49scFv2LHHLおよびCC49scFvのE_m (280nm)値はそれぞれ 1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

実施例 4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合}-\text{試料競取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合}-100\% \text{競合}} \times 100$$

“ゼロ競合(zero competition)”値は、1% BSAをビオチニル化CC49 (3×10¹⁰~14モル) と1:1比率で混合して測定し、一方 100%競合値はビオチニル化 CC49IgGと混合した CC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は 405nm~450nmで測定した。3回の競取り値の平均値を使

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析 (プローブ抗体としてビオチニル化 PAID 14を使用) に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、58,239ダルトンの位置に出現した。活性面分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いで Pharmacia社のMono S HR 5/5 カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの面分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの面分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで面分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S面分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は 0.8mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

等電点電気泳動

構築物の等電点(pI)は DNASTAR社 (米国、ウィスコンシン州、マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-titrateを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、FMC Bioproducts社 (米国、メイン州、ロックランド所在) の Isogel IEFプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記 IEFを操作するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在) の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで 500V (限定) および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社の IEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

用した。最初に試料(25μL)を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10 モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49 (4μg/μL 1:20,000に希釈、25μL使用) で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法(1:2)を行った。両方の形態の scFv2は IgGにほぼ等しい(図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体を Fabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの十分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全 IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IgGの親と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存の IgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍:組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

FIGURE 1

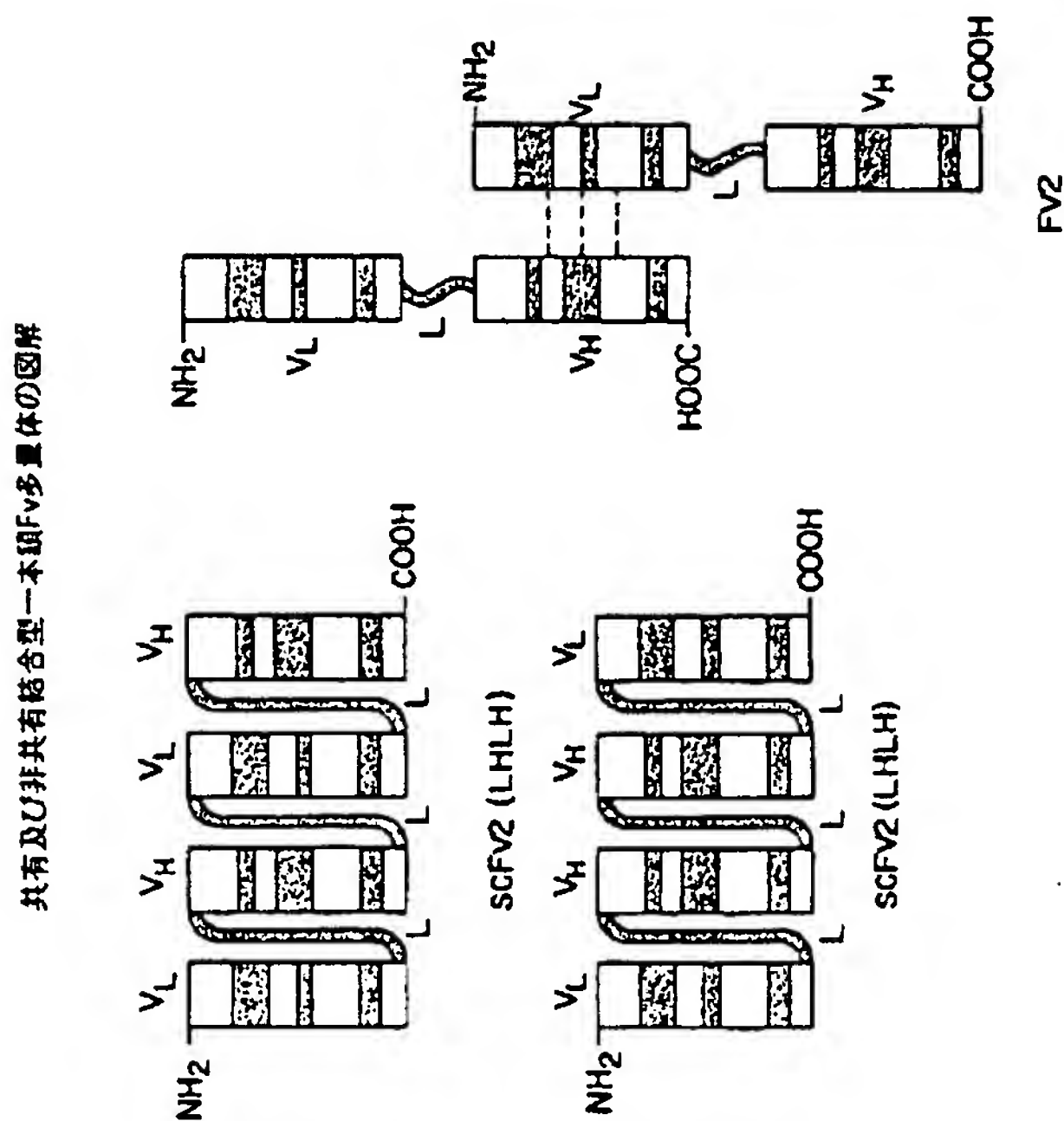


FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA
GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC
CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG CCC TGG TAC
CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG
GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCC CTC ACO TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG
AAG

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
 Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA
CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT
GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC
GTC TCC TCA

FIG. 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr
Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

淨書(内容に変更なし)

FIGURE 6

CC49 VL-L-VH-L-VL-L-VH-DNA及VP三ノ酸配列

| | | |
|--|--|--------|
| 46 | Gle I | EGR8 I |
| 5'-C TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TGA ATT CCA TCA CTY CCC TCC | | |
| 94 | GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACC AGG TCA TCA TTT CGT TCC GAA AAA | |
| 142 | ACG GTT GCA TTT AAA TGT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT | |
| 190 | TGT AAG ATT TCA TGT TTG AGT CCG CTG AAA GAT CGT ACG TAC CAA TTA | |
| 238 | TTG TTT CGI GAT TGI TCA AGC CAT ATC ACT GTA GGG ATA GTG GAA PENPR1- | |
| 286 | GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG AGG GAG ACG PENPR2- TAT AAG TTT GCC TCC CTC TG | |
| 334 | -22 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu ATT TTG ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACC GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA | |
| 382 | Nco I VL Leu Ala Ala Qln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro CTC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA | |
| 430 | 10 Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys TCC TCC CTA CCT GTG TCA GTT GCC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG | 20 |
| 478 | 30 Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala TCC ACT CAG ACC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC | 40 |

FIG. 6D

| Sequence | Position | Residue |
|---|----------|---|
| Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser | 1102 | Trp Tyr Cln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Trp |
| TTC TGT ACA AGA TCC GTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA | | TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG |
| Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala | 1150 | Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly |
| GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC CCA AAG AAA GAC GCA GCT | | GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT GCG TTC ACA GGC AGT GGA |
| Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile | 1198 | Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp |
| AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT GTT GAC ATT | | TCT GGC ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC |
| Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys | 1246 | Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe |
| GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCG GTG TCA GTT GGC GAG AAG | | CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACG TTC |
| Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn | 1294 | Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys |
| GTT ACT TTG ACC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT | | GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA |
| Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro | 1342 | Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys |
| CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT | | AAG GAT GCT GCG AAG AAG GAT GAT GAC GCT AAG AAA GAC GAT GCT AAA AAG |

FIG. 6E

| | | | |
|-----|---|-------------------|------|
| 330 | Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT | 340 | 1390 |
| | Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser CGC TTC ACA GGC ACT GGA TCT CGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC | 360 | 1438 |
| | Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr AGT GTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT | 370 b9VLCDB3-- | 1486 |
| | AGC TAT 380 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGT ACC AAG CTG GTG CTG AAG CTA | 390 | 1534 |
| | EcoRV III 400 Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys AGC GCT GAT GAT GCT AAG AAG GAC GCC GCA AAA AAG GAC GAC GCA AAA | 410 420 | 1582 |
| | Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp AAG GAT GAT GCA AAA AAG GAT CTG GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC | 430 | 1630 |
| | Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala GGC GAT GAT TTG GTG AAA CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCC AAG CCT | 440 | 1678 |

Fig. 6C

[illegible]

淨荷(内容に変更なし)

FIGURE 7

CC49 VL-L-VH-L-VH-L-VLのDNA及びアミノ酸配列

5'-C TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TGA ATT CCA TCA CTT CCC TCC 46
GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACG AGG TCA TCA TTT GCT TCC GAA AAA 94
ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT 142
TGT AAG ATT TGA TGT TTG AGT CCG GTG AAA GAT CGT ACG TAC CAA TTA 190
TTG TTT CGT GAT TGT TCA AGC CAT AAC ACT GTA GGG ATA GTG GAA 238
GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG ACG GAG ACG 286
ATT TTG ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA 334
Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro 382
CTC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA
Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys 430
TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG

FIG. 7B

Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala 40
TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC 478
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp 50
TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT GCT AAA CTC CTG ATT TAC TCG 526
Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly 70
GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTG CCT GAT GGC TTC ACA GGC AGT GCA 574
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp 80
TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ACC AGT GTG AAG ACT GAA GAC 622
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe 100
CTG GCA CTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACG TTC 670
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys 120
GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA 718
Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys 130
AAG GAT GCT GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA GAC GAT GCT AAA AAG 766
TTC CTA CGA GCG TTC TTC CTA TGNVL(-)SEQ

FIG. 6F

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn 450
TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GCG AAA CAG AAC 1726
Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp 470
CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT 1774
Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 480
GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA 1822
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser 490
GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT 1870
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr 510
GAG CAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC 1918
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser *** Nhe I
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA TAA AAA GCT AGC GAT 530 1966

FIG. 6G

GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014
SQP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT
PENPSEQ2- G TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT
CAT ATC ATT GTC CCG CAA TCG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062
AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC GGG AAA ATC GGT CTG CCG GAA AGC ACC 2110
GGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG GCG AAT GGG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158
BamH I
CGG ATC C-3' 2165

FIG. 7C

VH Xho I 140 150
 Asp Leu Glu Val Gln Leu Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro
 GAC CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTC AAA CCT 814

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT 862

170 180 910
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu
 GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA

190 CC89VHP- GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 200
 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Asn Glu
 TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 958

210 1006
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ser Thr
 AGG TTC AAG GGC AAG GGC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT

220 230 1054
 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT

240
 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA 1102

FIG. 7D

250 260 1150
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT

270 280 1198
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Glu Val
 AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAG GTT

290 1246
 Gln Leu Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
 CAG TTC CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT GGC GCT TCA GTG

300 310 1294
 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile
 AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT

320 330 1342
 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
 CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT

340 350 1390
 Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly
 TTT TCT CCC GGA AAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC

360 1438
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Val Gln
 AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG

370 1486
 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg
 CTC AAC AGC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA

FIG. 7E

380 390 1534
 Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC

400 1582
 Ser Leu Ser Ala Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Asp
 TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT

410 420 1630
 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln
 GCC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAG

430 440 1678
 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser
 TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTO TCA GTT GGC GAG AAG GAT ACT TTC AGC

450 1726
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
 TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC

460 470 1774
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 TTC GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT

480 1822
 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC GCT GAT CGC TTC ACA GGC

FIG. 7F

490 500 1870
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr
 AOT GCA TCT GGC ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT

510 520 1918
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu
 GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC

530 540 1966
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys ***
 ACG TTC GGT GGT GGT ACC AAG CTA GTG CTT AAG TAA AAA GCT AGC GAT

550 2014
 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT
 SQP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT

560 2062
 CAT ATC ATT GTC CGG CAA TGG TGT GGT CTT TTT TTT TCT ATC TTT
 PENTSEQ2- 0 TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT

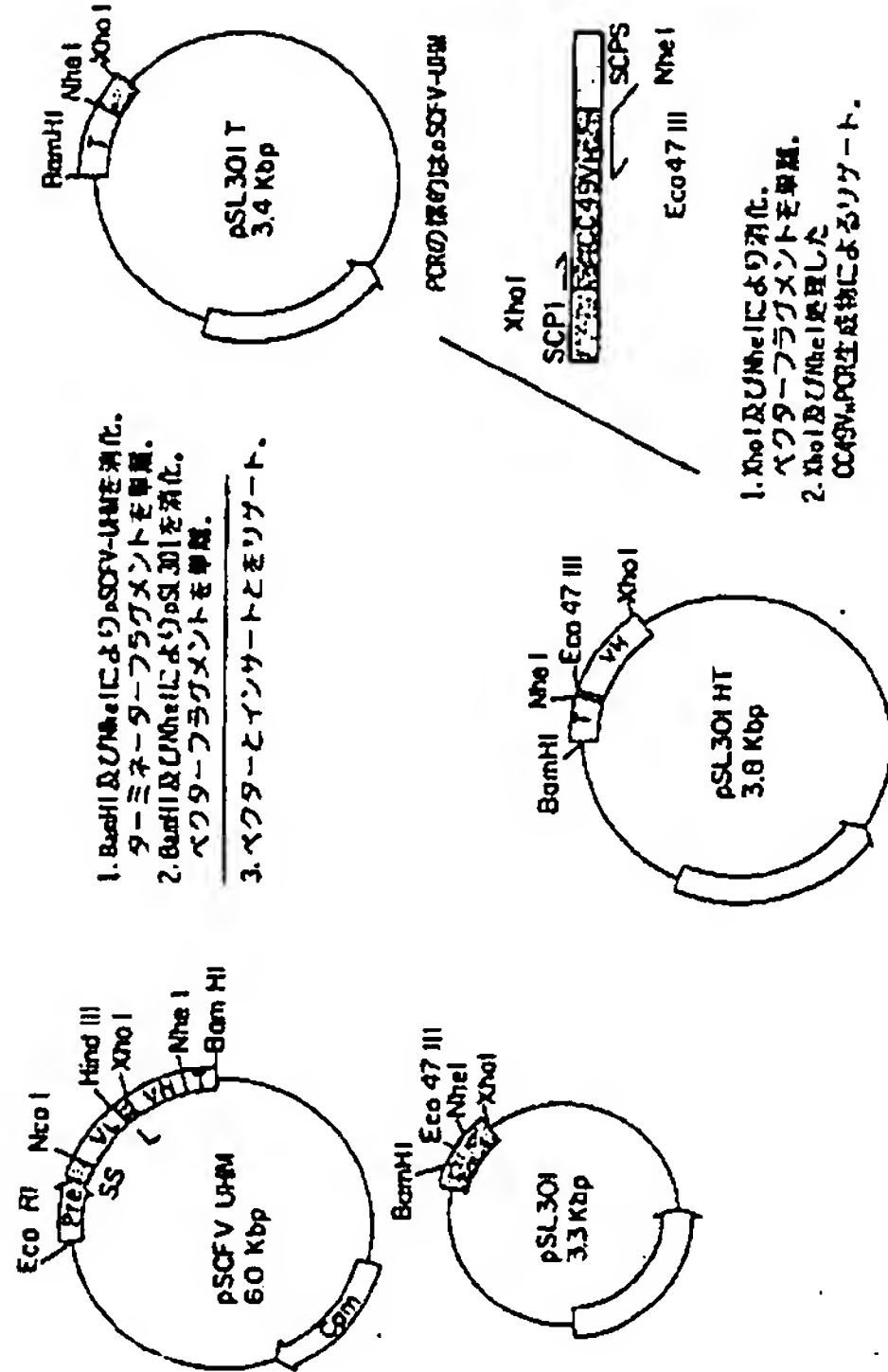
570 2110
 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC CGG AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC

580 2158
 GGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG GCG AAT GCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT

590 2165
 BamH I
 CGG ATC C-3'

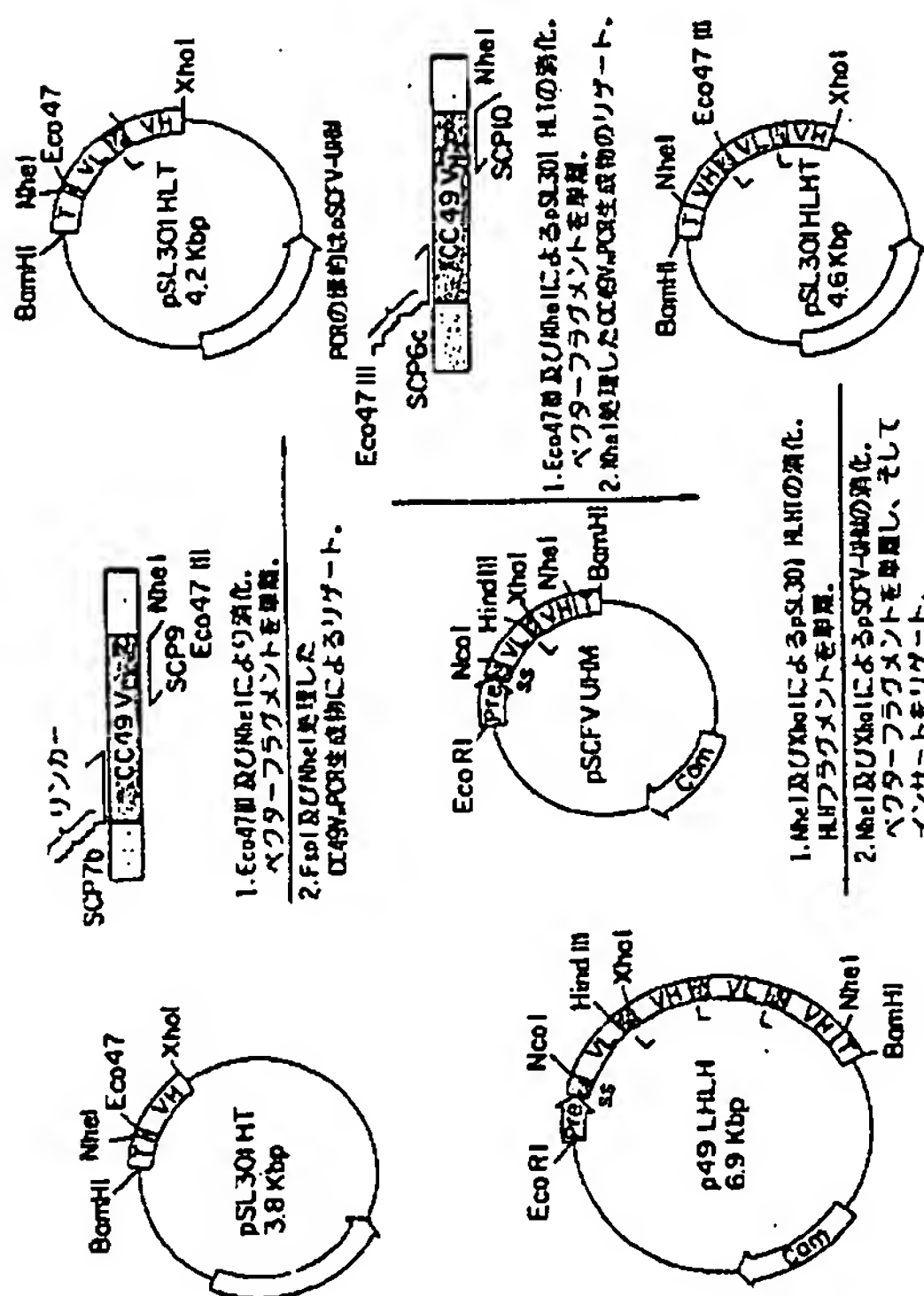
特許(内容に変更なし)

FIGURE 8

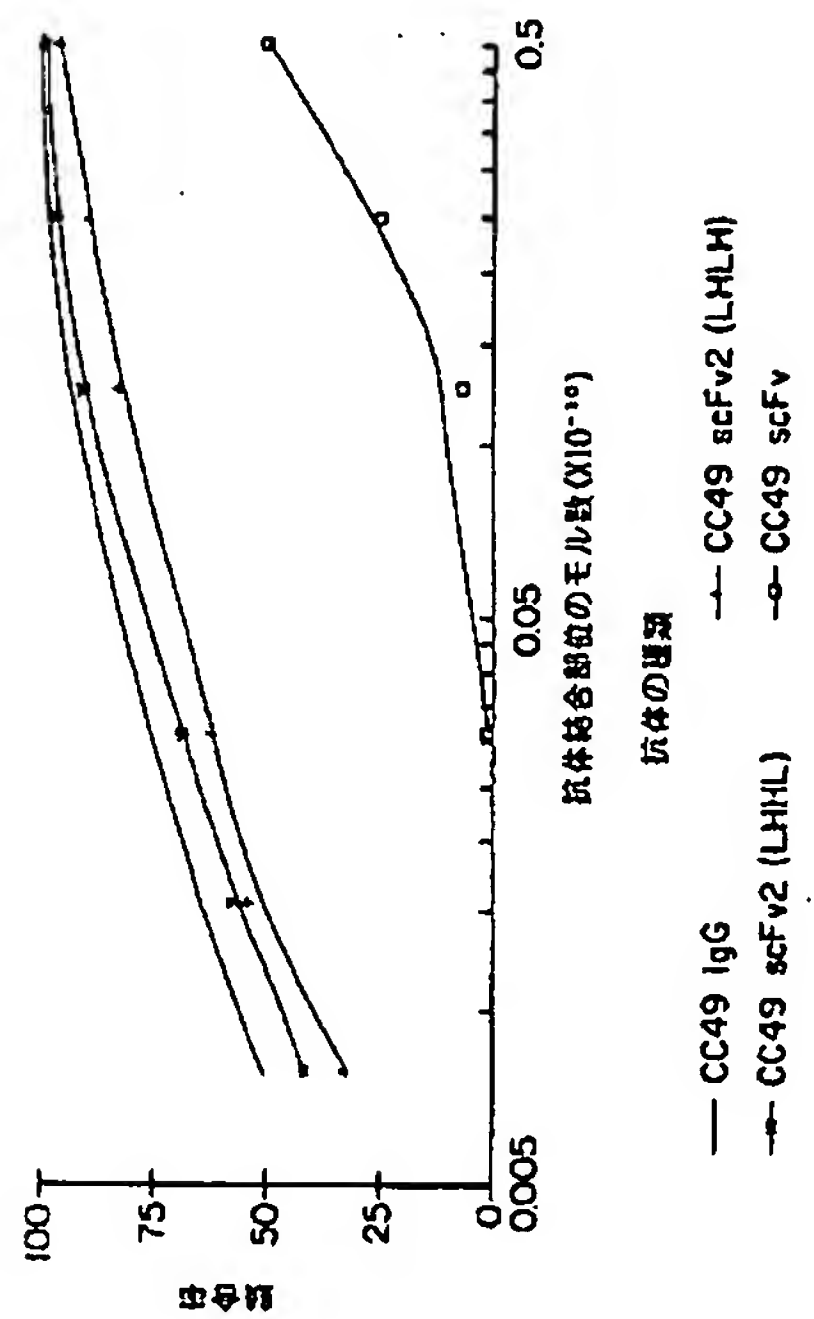


特許(内容に変更なし)

FIGURE 10



CC49 IgG, SCFV2 & SCFVの融合アッセイ
融合因子: ピオチニル化α49 IgG

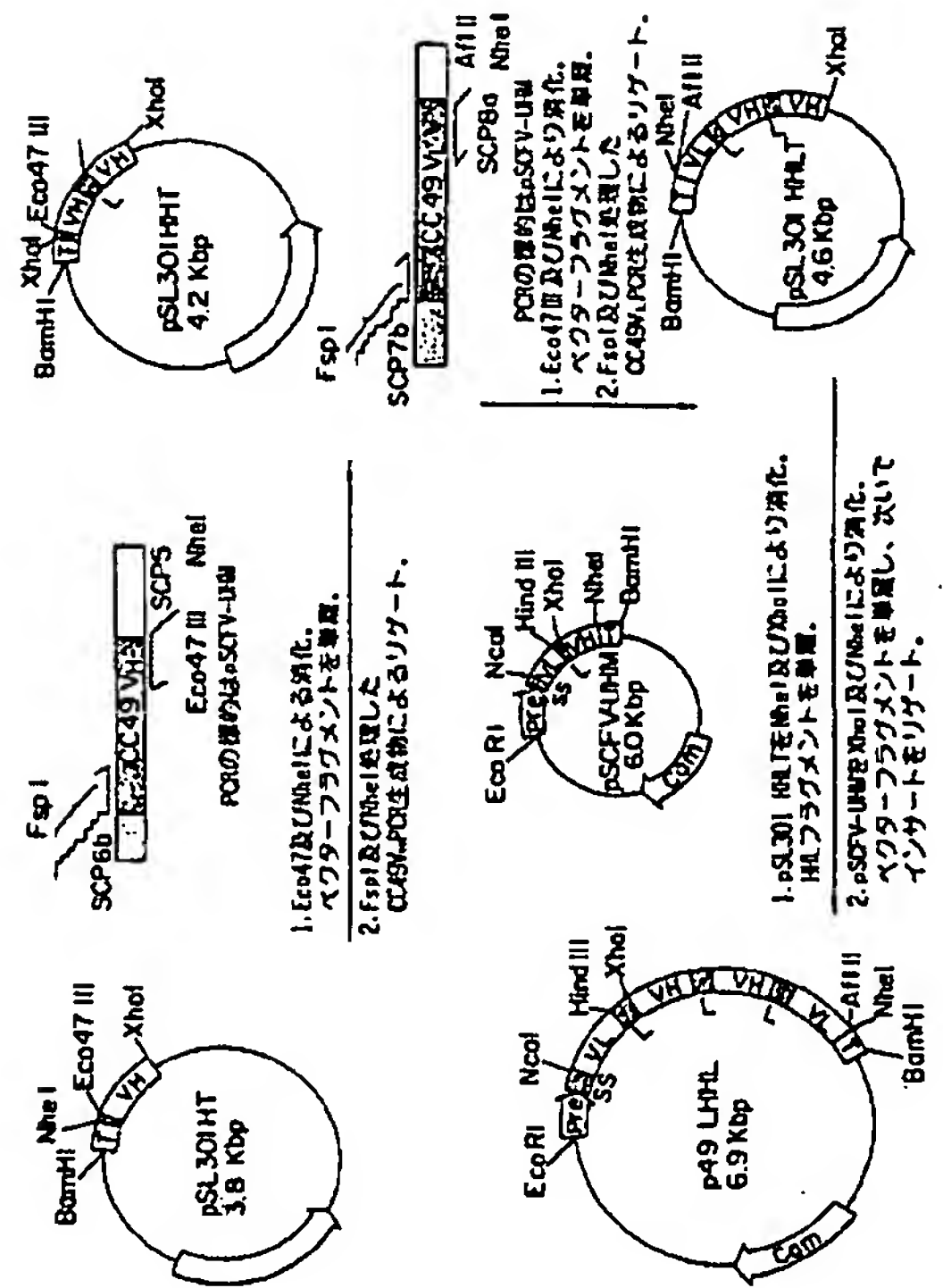


特許(内容に変更なし)

FIGURE 11

特許(内容に変更なし)

FIGURE 9



平成8年9月1日

特許庁長官 高 島 章 殿

1. 事件の表示

PCT/US 93/12039

2. 発明の名称

多価一本鎖抗体

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル

青和特許法律事務所 電話 3504-0721

氏名 弁護士(7751) 石 田 敏

5. 補正命令の日付

自発補正

6. 補正の対象

(1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文

(2) 図面の翻訳文

(3) 委任状

7. 補正の内容

(1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書(内容に変更なし)

(2) 図面の翻訳文の浄書(内容に変更なし)

(3) 別紙の通り



| | |
|---|--|
| 1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 C12N15/13 C07K15/28 C12N15/62 A61K39/395 | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | |
| 2. PRIOR ART In the art, documents relevant to the invention are known by the following references: IPC 5 C12N C07K | |
| Documents disclosed prior to the present invention are known to the public that such documents are included in the state of the art. | |
| Documents disclosed during the international search (prior to the date of the present application, search report) | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | |
| Category | Order of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages Reference to claim No. |
| X | WO, A, 91 19739 (CELLTECH LIMITED) 26 December 1991 see example 1 |
| Y | CANCER RESEARCH vol. 52, no. 12, 15 June 1992, PHILADELPHIA, PA, USA pages 3402 - 3408 T. YOKATA ET AL. 'Rapid tumour penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms' see page 3403, column 1, paragraph 4 |
| Y | 1, 5 2-4, 6 3, 6 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the annexes of the C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | |
| Special categories of cited documents: 'A' documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'T' documents defining the prior art which is considered to be of particular relevance 'C' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'D' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'E' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'F' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'G' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'H' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'I' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'J' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'K' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'L' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'M' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'N' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'O' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'P' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'Q' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'R' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'S' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'T' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'U' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'V' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'W' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'X' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'Y' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance 'Z' documents which are relevant to the invention but which are not considered to be of particular relevance | |
| Date of the present application of the international search report 25 March 1994 | |
| Date of the present application of the international search report 27 -64- 1994 | |
| Name and address of the applicant DOW CHEMICAL COMPANY, P.O. Box 1700, Midland, TX 79701-1700, USA Tel.: (817) 335-1000, Telex: 151111 DOW US, Fax: (817) 335-1000 | |
| Name and address of the agent Cupido, M. | |

PCT/US 93/12039

| Category | Order of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Reference to claim No. |
|----------|---|------------------------|
| Y | BIOCHEMISTRY vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA, USA pages 10117 - 10125 H.W. PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2 | 2, 4 |
| X | EP, A, 0 506 124 (TANOX BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 4 | 1, 6 |
| P, X | WO, A, 93 11161 (ENZON, INC.) 10 June 1993 see figure 19A | 1, 3-6 |

From PCT/US 93/12039 (international search report) (July 1994)

PCT/US 93/12039

| Priority documents used in search report | Publication date | Priority family members | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9119739 | 26-12-91 | AU-A- 7983191 | 07-01-92 |
| | | EP-A- 0488652 | 27-05-92 |
| | | GB-A- 2250999 | 24-06-92 |
| | | JP-T- 5502039 | 15-04-93 |
| EP-A-0506124 | 30-09-92 | AU-B- 640863 | 08-09-93 |
| | | AU-A- 1299292 | 15-10-92 |
| | | JP-A- 5117164 | 14-05-93 |
| WO-A-9311161 | 10-06-93 | AU-A- 1178993 | 28-05-93 |

From PCT/US 93/12039 (international search report) (July 1994)

フロントページの続き

| | | | |
|-----------------|-------|----------|-----|
| (51) Int. Cl. ° | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I |
| C 0 7 K 16/46 | | 8318 -4H | |
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | | |
| /(C 1 2 P 21/08 | | | |
| C 1 2 R 1:19) | | | |

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

/(C12P 21/08

C12R 1:19)

【F I】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 続 補 正 書

明 細 書

平成9年 7 月 2 日

多価の一本鎖抗体

特許庁長官 荒 井 秀 光 殿

1. 事件の表示

平成6年特許第514437号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

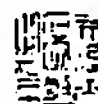
名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

3. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37ビル

特許法律事務所 電話 03-5470-1900

氏名 弁護士(〒151) 石 井 敬



4. 補正対象事項名

明細書及び請求の範囲

5. 補正対象項目名

明細書及び請求の範囲

6. 補正の内容

- (1) 明細書を別紙の通り補正します。
(2) 請求の範囲を別紙の通り補正します。



7. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 通
(2) 請求の範囲 1 通

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は4鎖体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV_L及びV_Hと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特性性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクティブ機能をもたらす。

アミノ酸配列データベースは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保守されたフレームワーク領域(FR)によりフランクされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保存性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特性性によって変異であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると想定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特性性を有するモノクローナル抗体は診断及び治療用の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適切なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に出

来する抗体の定常領域と結合されたものが経膜 IgA方法論により作られている。例えば、Sahagouら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986) ; Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1985) ; Nishimuraら、Cancer Res., 47: 999-1005 (1987) ; 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を暗示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体の中の主要部分を構成するFc領域を含有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、腫瘍組織に迅速に集申し、且つ結合する抗体様分子を得ること、及び未結合の抗体が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV_L と一本のV_H とにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs) が作られており、これは6つのCUEを含み、それらはペプチドリンカー (本発明特許第 4,946,978号) により連結されたV_L-L-V_H ポリペプチドを成しており、ここでLはペプチドリンカーを表している。V_L とV_H ドメインが互向V_H-L-V_L であるscFvsが米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて高い活性を有している。

従って、このポリペプチドの所性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築体を得ることが有利であろう。加えて、腫瘍組織上の別々のエпитーブの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース増強を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体増強を可能とする二価特異的である多価scFvを構築することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本のV_H と一本のV_L

ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の可変可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA配列を基とし、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基であろうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

図面の簡単な説明

図1は、V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H (LBH3) と V_L-L-V_H-L-V_L (LBH2)の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型Fv一本鎖抗体(Fv2)を示す。

図2は CC49V_L (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を示す。
図3は CC49V_L (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。
図4は CC49V_H (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。
図5は CC49V_H (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。
図6は p49LBH1(SEQ ID NO: 6) におけるCC49一本鎖抗体LBH1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LBH1(SEQ ID NO: 8) におけるCC49一本鎖抗体LBH1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL3017及びpSL3018Tの構築を示す。
図9はプラスミド p49LBH1の構築を示す。
図10はプラスミド p49LBH1Hの構築を示す。
図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、競合アッセイとしてビオチニル化 CC49IgGを用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に記入する。

領域、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらにIUPAC IU 3 (Commission on Biochemical Nomenclature) 又は関連分野の実態に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、V_L-L-V_Hにより成られる、ペプチドリンカー(L)によりV_Hドメインに連結されたV_Lドメインを含むポリペプチドを意味する。V_LとV_Hドメインとの順序は逆であってよく、V_H-L-V_Lとして表わされるポリペプチドが獲得であろう。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗

体フラグメントを意味する。この一本鎖フラグメントは連結されて、

V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H ; V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L ; V_H-L-V_L-L-V_H-L-V_L ; 又は
V_H-L-V_L-L-V_L-V_H

のV_LとV_Hドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、V_LとV_Hドメインの数は等しい。

本発明は、

V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_L 又は V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H

で表わされうる多価の一本鎖抗体も提供する。

V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H (LBH3) 及び V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L (LBH2)の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型Fv一本鎖抗体(Fv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の経鎖及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。選択されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起原が必要とされる。適当な DNA配列は公共の起原から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Servicesにより公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版(1991)は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を提示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローニングする DNAの起原として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起原は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カクログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Cu

Flare Collection, 20300 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1099) を参照のこと、その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な寄推動物、通常は家畜動物として最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は腫瘍の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH) の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施されう。通常、最後の負荷の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを誘導するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。

腫瘍の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_H 及びV_L ドメインは好ましくは、1989年3月3日に公開された PCT出願 WO 86/04410 及び1989年1月26日に公開された PCT出願 WO 89/00592 に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質T2抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開 WO 93/04410 及び WO 89/00592 においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV_H 及びV_L ドメインである。CC49のV_H をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1) は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_L のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2) は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_H をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3) は図4に示すものと実質的に同じである。CC49のV_L をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4) は図5に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V_H とV_L ドメインを連結するための適

当なリンカーは、V_H とV_L ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものと構法に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV_H 及びV_L ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に記入れる米国特許第 4,546,778号に開示の方法により獲得できよう。この第 4,946,113号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できよう。

好ましくは、V_H とV_L ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように追加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PettolissioらのBiochem. 30, 6117-10125(1991) に開示されている2050と称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるKspI部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に変えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5) は下記の通りである:

Leu Ser Ala-Asp-Asp-Ala-Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Lys-Asp-Leu

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発明媒体にはプラスミド又はその他のベクターが

含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(E. coli) (pBR322を用いて容易に形質転換される(Beliverら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. cerevisiae (S. cerevisiae) 又は一簇のパン酵母が真核微生物の中で最も一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばシシア パストリス(Pichia pastoris) が有用である。多細胞動物、例えばATCCより入手できるSP2/0又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できよう。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドは pSV2neo及び pSV2gpt(ATCC); pSV1及びpKSV-10 (Pharmacia), pDPV-1/pMT2d (International Biotechnology, Inc.) である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための動物及び植物ウィルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入部位において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域によって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより終端し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前記に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築体は、構造的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び変成過程とつう合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって適宜の要素が必要とされよう。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその

生成物が形成及び折りたたみを助長するために必要とされよう(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たすように簡単に改変されよう。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組織 DNA技術を用いて構築されたベクターにより組織的に形質転換されよう細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することも意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されよう。この態様において、かかる異なる形質転換細胞の培養物は生存のために誘致された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されよう。例えば、もしそれらが培養環境の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は例外濾過により濃縮されよう。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、細胞はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで例外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を實行することにより達成されよう。不溶性であり、且つ固形体(refractile bodies)、通常封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を溶解するための波心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HCl による可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できよう。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば結合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA) 及びラジオイムノアッセイ(RIA) により決定できよう。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大よめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そ

して身体からより迅速に排除される。

診断及び／又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び／又は増設の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように精製される。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び／又は治療において有用な時に好都合な薬型組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表面上で発現される。診断及び／又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって結合される。本発明の薬型組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の場合、溶液又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を呈示する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

略 語

| | |
|--------------|------------------------------------|
| BCIP | 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドールホスフェート |
| bp | 塩基対 |
| Bis-Trisプロパン | (1, 3-ビス〔トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ〕プロパン) |
| BSA | 牛血清アルブミン |
| QDR | 相補性決定領域 |
| ELISA | 酵素結合免疫吸着アッセイ |
| Fv2 | 非共有一本鎖Fvダイマー |
| IEP | 等電点電気泳動 |
| Ibp | キロ塩基対 |
| LD | Luria-Dertau; 増殖 |
| Mab | モノクローナル抗体 |
| MES | 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸 |
| MR | 分子量 |
| NBT | ニトロブルーテトラゾリウムクロリド |
| オリゴ | オリゴヌクレオチド |

プラスミド

pSCPV.UIM : 23のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変領域とCC49可変領域とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHL-Xは p49LHL : CC49scFv2 LHL3又はLHL4生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細書に組み入れる。 Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York第2版(1989)及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び増強

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、塩基の5'-シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で6-15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30-40μlの蒸留水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-琼脂ゲルトでの電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mLの100mMのトリスメTH, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム (Millipore, Bedford, MA) に適用し、そして結合したオリゴを80%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶液の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD₂₆₀)での光学密度を測定することにより決定した。

細胞懸濁消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD),

| | |
|----------------|-------------------------------|
| PAGE | ポリアクリルアミドゲル |
| PAGE | ポリアクリルアミドゲル電気泳動 |
| PBS | リン酸緩衝食塩水 |
| PCR | ポリメラーゼ連鎖反応 |
| pSCPV | scFvをコードする DNA配列を含むプラスミド |
| SICS | ラジオイムノガイド外科 |
| ETC | ラジオイムノ治療 |
| scFv | 一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントモノマー |
| scFvs | 共有結合した一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントダイマー |
| SDS | ドデシル硫酸ナトリウム |
| TBS | トリス緩衝食塩水 |
| トリス | (トリス〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン) |
| TBS | ツイーン20洗淨液 |
| V _H | イムノグロブリン重鎖可変ドメイン |
| V _L | イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン |

抗体

CC49 : ヒト腫瘍関連タンパク質T2(TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体 ; ATCC No. HB9459として寄託。

CC49Fab : 重鎖のN-末端領域に連結している完全軽鎖より成るCC49の抗原結合性領域。

CC49scFv : ペプチドリinkerにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2 : ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。Fvの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えばCC49Fv0は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2 : 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49V_Lドメインと2本のV_Hドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_L(L)とV_H(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある : LBLH, LHLH, LHLH, HLLH, HLHL及びHLLH。

New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA) 又はBoehringer Mannheim (BM, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをニチジウムプロミドで染色し、そのDNAバンドを短波紫外により可視化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ (Falcon Cartridge Corp., Chicago) の中に入れた、そしてMax Submarine電気泳動装置(Boehringer Scientific Instruments, CA)を用いて常態させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール法にさせ、そして蒸留水の口で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調整したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド36穴マイクロタイタープレート (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200μlのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25μlの抗腫抗体及び25μlのビオチニル化CC49 (1/20,000希釈率の1μg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間、合計抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる結合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び／又は濃LDとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50μl (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液(Nitrohexad & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Mu

ecular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404～450 nmでの光密度スキャニングにより測定した。scFv2の場合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の割合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20μl)を、非還元用サンプル調製バッファ(Sepraso)1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして、0-20%勾配のポリアクリルアミド Gelic hi Bioequalにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当り55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーR-250(Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め定められており(Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた：ホスホリラーゼα、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オвалブミン、ラクトートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、γ-ラクトグロブリン及びクロムC。対応の分子量はそれぞれ85,000、55,000、43,000、38,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15-20分平衡にした。Immobilon P-PVDF(ポリビニルデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一滴の陽極バッファ#1を陽極電極面の中央に滴せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを陽極バッファ#1の中に浸し、そしてその電極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に置き、そして最後に陰極バッファ(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mAの定常電流(初期電圧は8-20ボルトに範囲した)を用いて30分で遂げられた。

造者のプロトコールに従ったが、ただし陽極バッファとして0.1Mのクエン酸ナトリウム, pH3.0を用いた。固分を0.0Mのトリス-HCl(pH9.0)を用いてpH7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FA1014(10μg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa₂CO₃, pH9.6と混合した。ビオチニル化-アミノ-カプロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20μl)をFA1014溶液に加え、そして22℃で7時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8μl/minの流速で、ビオチニル化FA1014は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する画分をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V₂及びVicCNRにより決定されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

等電点電気泳動(IEF)

等電点(pI)は、PhastPA3(Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATIONという名のコンピュータプログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてpI値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isco917アガロースIEFプレート、pH域3-10(PHRCIproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、200nAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEF標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、γ-ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3-レンチルレクチン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65、5.10、6.00、6.50、7.00、7.10及び7.50、7.80、8.00並びに8.20及び9.50である。ゲルを、PHCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体種の定量

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical(Rockford, IL)より、チンキ緩衝液として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH7.6を供する。これらの膜を最少限1時間は、室温でブロックし、そして20mlづつの0.5%のツイーン20洗滌液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTTBSのリッター当り混合した。使用したブローブ抗体は20x1のビオチニル化FA1014溶液とした(10μg/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当り1gのBSAを加えることにより作った。室温で30-60分ブローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温において30-60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの標合されたストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl₂・H₂O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼに対するの基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(Sung, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液を、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色膜からそれらを水で洗い流した。

ビオチニル化 FA1014

FA1014は、CC49に対して特異的な、ATCC No.CRL10256として寄託されているネズミの抗-イデノタイプ抗体1g52a、Kアイソタイプ)である。FA1014をHygea Protein A-アフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製

FIG. scFv2の種および単量体cFvを含む精製CC49抗体はすべて、混合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS分光光度計562A型を用いて、タンパク質溶液の280nm波長の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E_m)は、各抗体について、下記式を用いて決定した。

$$E_m = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 - ((\text{Cys})2 \text{ 残}) \times 150 - (\text{Pro数}) \times 10$$

これらの値は、B.A.Gallavar, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375-378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン製配管を用いたIEP HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型検出器、270nmの吸光度に設定されたUV CORC 5II 2238型検出装置および2211型 SuperBac fraction collectorで構成されている。

サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150μg/μlのプラスミド模板(pSCFV2RN)；100ピコモルのプライマー；1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウェーク所在のPEC社)のAmpli-Tagポリメラーゼ；10μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている)；ならびに合計容積を100μlにするのに充分な水で構成された反応混合液で行った。PCR反応はメーカーが定量化しているのと同様にして行った。これらの反応は、PRC 5600型サイモサイクラー(thermocycler)を用いて36サイクルを行ったが、その1サイクルは、94℃で20-45秒間のDNAの露性；52-60℃で0.5-1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5-2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の330A型もしくは591型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100ngのベクター DNAおよび対照する1:1化学量論的当量のインサート DNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在）のT4 DNAリガーゼキットを用い、製メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物（全容積20μL）は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、100μLのStratagene社の大腸菌（E.coli）AG1コンピテント細胞（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社）を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA（1〜5μL）を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス（LB）中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCFV210、p49LHLもしくはp49LHLに月いる20μg/mlのクロラムフェニコール含有（CM20）ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100μg/mlアンピシリン（AMP100）ルリア寒天プレート（LB+AMP100）上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社（米国、ウィスコンシン州、マディソン所在）のMagicミニプレッププラスミド製造キットを用いて、海太圧（selection pressure）を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から分離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドの構築

p49LHLおよびp49LHLと命名された3種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLを含有する宿主細胞は、V_H-L-V_H-L-V_H-L-V_Hで与ることができるポリペプチドを産生した。ここでV_HとV_LはCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー（L）は、下記SEQ ID NO:5の配列を有する25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys-Asp-Ala-Ala-Lys Lys Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asu-Leu

p49LHLを含有する宿主細胞は、V_H-L-V_H-L-V_H-L-V_Hで与ることができる

示した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびNheIによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片（図8に示す958〜2165の塩基対（bp））を含有するクローンをpSL301HTと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。XhoI〜BamHI-penPターミネーターをpSL301中に配置した理由は、そのNheIとEamHIの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限ニンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構築体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要があるV_HとV_Lの領域を挟いて構築するため設計された。各V領域がEco47III-NheI部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

V_H配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV210を用い、オリゴの5' SCP1と5'オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列（SEQ ID NO:10）とSCP5に対するRNA配列（SEQ ID NO:11）は次のとおりである。

SCP1: 5'-TAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'
SCP5: 5'-TAA GGT ACC ACCA ACC GCT TAG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT-3'
下線を付けた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV_H DNAを、4%のPAG、電気泳出、エタノールによる沈澱および20μL水への溶解によって増幅した。そのV_H配列をXhoIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され残って構築されたpSL301ベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分（4μL）を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB+AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V_Hインサートを含有していることを示す顕微鏡的クローンをNheIおよびXhoI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical（USB）社（米国、オハイオ州クリーブランド所在）のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB（pSL301ベクター中、XhoI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー）とCC49VHPを用いて、DNAの原列決定を行って、（CC49V_Hの配列を導出し、pSL301HT中に正しいCC49V_H配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドは

ポリペプチドを産生した。ここでV_HとV_LはCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_H（p49LHL）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO:6）とアミノ酸配列（SEQ ID NO:7）を図6に示す。CC49V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H（p49LHL）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO:8）およびアミノ酸配列（SEQ ID NO:9）を図7に示す。

pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニファリス（Bacillus licheniformis）のペニシリナーゼP（penP）ターミネーターの配列を、XhoIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCFV210と命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳出させ、エタノールで沈澱させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301（米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社）中の同じ部位に連結した。pSCFV210の製造手順は、1992年8月21日付け出版の米国特許第97/925,605号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本発明に適用するものである。一段に、pSCFV210は、penPプロモーターのヌクレオチド配列；固有NcoI制限部位；CC49V_H領域；BamHI制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；固有XhoI制限部位；CC49V_L領域；NheI制限部位；penPターミネーター；およびBamHI制限部位を含有している（図8参照）。このpenPプロモーターとpenPターミネーターは、Beasら、J.Biol.Chem., 258巻、11211〜11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部（3μL）を、LB+AMP100寒天プレート上にプレートし、次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミネーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社（米国、メリーランド州、ガイサースバーグ所在）のT7 QuickprimeTM DNA増幅キットと、Bulowelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-NheI-BamHIターミネーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使

pSL301-HLTおよびpSL301-HLTの両方を構築するときの出発点で使した。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB（SEQ ID NO:12）およびCC49V_L（SEQ ID NO:13）のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5'-YCG TCG GAT TAG GCA ACC TTA 3'
CC49VHP: 5'-GAT GAT TTT AAA TAG AAT GAG 3'

実施例1 pSL301HLの構築

pSL301HT（5μg）を出発物質として用い、これをEco47IIIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを構築した。CC49V_H挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCP6を用いかつ3'オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP6Bのヌクレオチド配列（SEQ ID NO:14）は下記のとおりである。

SCP6B: 5'-TAA TCG CCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC CCA GCT AAA AAA GAG GAT GCC AAA AAG CAT GAC GCC AAG AAA CAT TTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT-G'

またオリゴSCP6Bはリンカーのコーディング領域の一部（SEQ ID NO:14のbp6〜78）を含有している。pSCFV210中のCC49V3体的でアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO:14中のbp77〜90由来のものである。

下線を付けた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを増殖し、PspIとNheIで消化し、次いでpSL301HT-Eco47III-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた（図7）。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物（3μL）で形質転換を行うのに用い、LB+AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXhoI-NheIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSCP1を用いて決定し、正しい配列（SEQ ID NO:15）のヌクレオチド（124〜1543）を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SCP1のヌクレオチド配列（SEQ ID NO:15）は下記のとおりである。

SCP1: 5'-TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'
最終のリンカーV₃サブユニット（bp1544〜1663、図7）は、5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP8aを用いかつPCRの標的としてpSCFV210を用いて製造

した。SCP7tのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16) は下記のとおりである。

SCP7b: 5'-TAA TGC GCA GAT GAG GCA AAG AAA GAG GCA GCT AAA AAA GAG GAT
GCC AAA AAG GAT GAG GCC AAG AAA GAT CTT GAG ATT CTG ATG TCA CAG TCT
CC

下線をつけたヌクレオチドは Fsp I 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17) は下記のとおりである。

SCP8a: 5'-TAAA GGT AAC TTT TTA CTT AAG CAC
CAG CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の二塩は Nhe I 部位に相当し、もう一つの塩は Afl II 部位に相当する。SCP7Dのヌクレオチド8〜76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544〜1612)、一方V_Lにアニールするヌクレオチド77〜99は図7の1612〜1635に相当する。プライマー SCP8aは、その3'末端の短いチール、Nhe I 制限部位、終止コドン、Afl II 制限部位およびV_Lの最後の23個の塩基を含有している。Fsp I と Nhe I による消化の後、この得られた 420bpのインサートを精製して精製pSL301HITベクターの Nhe I と Eco47 III の部位に連結し、最終的なクローンを Nhe I と Ito I でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつIGLPR2 (-) とSQP1で配列が決定されて、pSL301HIT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18) は下記のとおりである。

49LPR2 (-): 5'-CTG CTG GTA CCA CGC CAA G-3'

プラスミドpSL301HITを Xho I および Nhe I で消化し、精製し、得られた1170 bp V_H リンカー-V_H リンカー-V_L セグメントを pSCFV UHMに連結して p49LHLHを製造した。なおこの pSCFV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4 μl 部分)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBGA M20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHLHを含有させるために選択した。p49LHLHは、GC49 多価一本鎖抗体 scFv2: V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H またはGC49scFv2 (LHLH)のpenP プロモーターとヌクレオチド配列を含有している。

りは次のステップで修正され、オリゴSCP6C (SEQ ID NO: 21) の末端に5塩基の欠失を補正することによってpSL301HITを製造した。

SCP6C: 5'-TAAGCCTGTATGATGCTAAGCAAGGACGCCGCAAAAA
CCACGACGCCAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTCG
AAGTTAGTTGACGACGCTCTGAC-3'

SCP6Cの下線をつけた配列は Eco47 III 部位に相当する。PCRにおいて、SCP6Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP1Gは3'オリゴとして用いられて、リンカー CC49V_L セグメントが生成する。SCP1G のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22) は下記のとおりである。

SCP1G: 5'-TGG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA
CTG AGG TT 3'

SCP1Gの下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1938〜1963に見られる Nhe I 部位に相当する。この場合、PCRインサートは Nhe I だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL301HIT)は Eco47 III 部位(先に形成されている)および Nhe I 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μl)を使ってコンピテント イー・コリAG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンを Iho I と Nhe I でスクリーニングした。正しい大きさの DNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCOR3 (-) およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCOR3 (-) の SEQ ID NO: 23) は下記のとおりである。

49VLCOR3 (1): 5' CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1533〜1863からの配列が確認され、正しいpSL301HITクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、pSL301HIT(5 μg)を Nhe I と Ito I で消化し、次いで V_H-L-V_L-L-V_L 配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCFV UHM(5 μg)を Iho I と Nhe I で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4 μl)を使ってコンピテント大腸菌AG1

実施例2: p49LHLHの構築

p49LHLHの構築を図10に図式的に示す。リンカーV_Lのサブユニットをオリゴの SCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5'-TAA AGC TAG CAC CAA CCC CTT AGT TTC
ACC ACC AGC TTG CTC CCA G 3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド3〜76)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図6のV_Lのヌクレオチド1193〜1215に相当する。PCRに対する pSCFV UHM断片(ヌクレオチド77〜99)にアニールした。

SCP9は、Nhe I 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47 III 部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるための pSL301HITを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18〜23は図6のヌクレオチド1532〜1537(リンカーの最初の2組のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24〜46は、PCRにおけるSCP5 (SEQ ID NO: 19)のアニール領域である図6に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミドpSL301HITを Eco47 III と Nhe I で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め Fsp I と Hae I で処理され精製された、PCRからのリンカー CC49V_L DNA インサートと連結させる。その連結混合物(3 μl)を用いて大腸菌AG1コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい Nhe I - Nhe I の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ pEFP:SEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 20) は下記のとおりである。

5' TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G 3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HITクローン中に PCRの誤まりと欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する5塩基の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531は DNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...CAAGCCGCT ...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47 III 部位を形成した。図6のAGGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この配列

細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAN20 プレート上にプレートし、次いで p49LHLHに対する代次的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)および TAG 72に対する生物活性に基づいて選択した。

実施例3 GC49 scFv2のLHLHとHHLHが共有結合した二量体の精製

GC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ粗抽物の画分を、p49LHLHと p49LHELの両者の 1.0Lの一夜培養物から調製した。長約すると、培養物を 250mlずつの4部分に分割し、Sorvall GS-3ロータで10分間 5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.8からなる 100mL中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計 100mLの30mMトリス-HCl pH 3.3で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v %のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL)および10mM EDTA pH 7.5(2.0mL)を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、空室に10分間保持した。高張性細胞(hypertonic cell)を精製のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mlの水浴 0.5mM NaCl中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら水上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の画分を含有する上澄み液を、0.2 μmの Nalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentrifuge 30およびCentricor 30で 1.6mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたは p49LHELのクローン由来の濃縮周辺細胞質のシェケート(she kete)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HR 10/30 BFG カラム(予め PBSで平衡化させたもの)に注入した。結合 ELISA法で測定する場合、問題の生成物は 0.5ml/分の流量で2〜24分間放出させた。活性画分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3〜4回交換しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料を Pharmacia社のH025 Q Hx 5/5アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとし

て20Mトリス-HCl pH 7.6に0.5M NaCl を含いる勾配プログラムを、1.5ml/min の流量で使用した。問題の生成物は、競合 ELISA法で判定する場合、各々3〜4分間カラムから放出させた。この時点の両分の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクローミングリアントブルー3250で染色し、他方のゲルはウエスタン分析（ブローブ抗体としてジオチニル化 PAID 14を使用）に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、56,239ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MOPS pH 5.8に対して一変透析し、次いで Pharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの両分の二つの画分の5と6は、SELS-FAC法およびELISA法で判定する場合、免疫反応の増強が開始される直前に放出された。したがってこれらの画分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで画分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mM トリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.8ml/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5〜8分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

等電点電気泳動

精製物の等電点(pI)は DNASAR社（米国、ウノスコンシン州、マディソン所在）のコンピュータプログラム Protein-Titrateを使用して予測した。アミノ酸組成、鎖およびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社（米国、メーン州、ロックランド所在）のImmol IEPプレートpH範囲3〜10を使用して測定した。上記IEPを操作するために、Biorad社（米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在）の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V（限定）および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は30分間で完了した。Biorad社のIEP機準品は、フィコシアニン、βラクトグロブリンB、ウシカルボニクアンヒドラーゼ、ヒトカルボニクアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメンクチンおよびシトクロム

機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の値に比べて全IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IgGの鎖と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布運動能の利点を有することを示している。この利点によって、既知のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ増治療に用いる免疫治療法において腫瘍：組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施形態は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を實施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の目的の範囲と思想は以下の請求の範囲によって示される。

以 上

じが含まれ、pI値はそれぞれ4.55、5.10、6.40、6.50、7.00、7.50、7.8、8.0、8.20 および 8.6であった。ゲルは PNCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTAR プログラムによって両方の scFv2の種のpI値として 5.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の 6.5の位置にみとめられた。

IgG、scFv2（LHLHおよびLHHL）のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値 ϵ_{280} は各々、先に引用した Wetliawerの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG、CC49scFv2(LHLH)、CC49-scFv2(LHHL)およびCC49scFv2の ϵ_{280} (280nm)値はそれぞれ 1.43、1.65、1.65 および1.71であった。

実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCC49抗体にFLAGペプチドを有する単量体scFv鎖と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合 - 試料競取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合 - 100\%競合}} \times 100$$

“ゼロ競合(zero competition)”値は、1% BSAをジオチニル化CC49（3×10〜14モル）と1：1比率で混合して測定し、一方100%競合値はジオチニル化 CC49IgGと混合した CC49IgGの5 μg/ml試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は 405nm〜450nmで測定した。3回の試料取り値の平均値を使用した。最初に試料（25 μL）を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10 μLの結合部位/mlで塗布した。ジオチニル化CC49（4 μg/μL 1：20,000に希釈、25 μL使用）で試料を1/2濃度に希釈した。逆転写反応（1：2）を行った。両方の形態の scFv2は IgGにはV等しい（図11参照）。別の試験で、CC49scFv単量体を Fabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に

請求の範囲

1. 2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されており、この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys
Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは：

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、多鎖の一本鎖抗体。

2. 前述軽鎖可変領域が下記の配列

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

と實質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前述重鎖可変領域が下記の配列

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
Gly Glu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。
3. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. 多価の一本鎖抗体をコードする DNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されており、そして各フラグメントは：

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる

第二のペプチドリンカー；
を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GAC ATT CTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA
GTT GCC CAG AAG GTT ACT TTC AGC TGC AAG TCC ACT CAG AGC
CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC
CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CTT AAA CTG CTG ATT TAC TGG
GCA TCC GGT ACC CAA TCT GGG CTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
AGT GGA TCT GGG ACA CAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GGT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

CAG CTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT CAG TTC GTG AAA CCT
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAC CTT GAA
CAG GCC CTG GAA TCG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT CAT
CAT TTT AAA TAC AAT CAG AGG TTC AAG CCC AAG GCT ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC GTG CAG CTC AAC
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA ACA
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA CTC ACC
GTC TCC TCA

と実質的に同じである、請求項1記載の DNA配列。